UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

280

O. VERONA

Azione sui lieviti e, in particolare, sui lieviti della fermentazione vinaria, delle vitamine K_3 e K_5

(Estratto dagli Atti dell'Accademia Italiana della Vite e del Vino)
Vol. IV - (1952)

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
17 DEC 1952

VALLECCHI EDITORE FIRENZE

ACCADEMIA ITALIANA DELLA VITE E DEL VINO — SIENA

Prof. ONORATO VERONA

Azione sui lieviti e, in particolare, sui lieviti della fermentazione vinaria, delle vitamine K_3 e K_5

(*Estratto dagli Atti dell'Accademia Italiana della Vite e del Vino*
Vol. IV - (1952)

VALLECCHI EDITORE FIRENZE

AZIONE SUI LIEVITI E, IN PARTICOLARE, SUI LIEVITI DELLA FERMENTAZIONE VINARIA, DELLE VITAMINE K_3 E K_5.

Comunicazione dell'Accademico Prof. Onorato Verona

È noto come, con il termine di vitamina K — derivato dall'espressione tedesca « Koagulations-Vitamin » — si intenda un composto ad attività antiemorragica intravisto nel 1929 da Dam e dallo stesso, in collaborazione con altri, successivamente meglio studiato.

Tale principio, assai diffuso nei vegetali (specie nelle foglie di erba medica, castagno, spinacio, cavolo, ortica), è stato trovato anche tra i prodotti di putrefazione della farina di pesce e altresì nel corpo di molti microrganismi (*Bac. subtilis, Esch. coli, Staph. aureus,* ecc.). Con la lettera K_1 fu indicato il fattore antiemorragico presente nei vegetali e con la lettera K_2 quello rinvenuto nei prodotti animali. Quindi, come Almquist e Klose indicarono nel gruppo 2-metil-3ossi-1,4-naftochinone il gruppo attivo di queste vitamine (la K_1 è il 2-metil-3-fitil-1,4-naftochinone e la K_2 è il 2-metil-3difarnesil-1,4-naftochinone) numerosi altri composti chinonici furono saggiati nella loro azione antiemorragica. Tra i più attivi si dimostrò il 2-metil-1,4-naftochinone, facilmente ottenibile per sintesi dalla 2-metilnaftalina. Questo composto fu tecnicamente siglato con la lettera K_3 e denominato menadione. Ma buona efficacia presentano anche altri composti di sintesi e tra questi, ben noto, è il 4-amino-2metil-1-naftolo cloridrato o vitamina K_5.

D'altra parte, la nozione che alcuni metaboliti fungini ad azione antibatterica contengono nella loro molecola il nucleo chinonico, ha suggerito di saggiare queste vitamine anche nella loro azione antisettica, azione — diremo subito — dimostratasi veramente notevole.

Infatti, proprietà fungicide verso *Pythium, Rhizoctonia, Glomerella, Chaetomium, Metarrhizium, Stachybotrys, Aspergillus, Penicillium,* furono

già dimostrate per il 2-3-dicloro-1,4-naftochinone da Horst e Felix. Successivamente Vinet registrò effetti inibitori verso *Asp. niger* da parte del 2-metil-naftochinone, 2-cloro-naftochinone e 2-cloro-3-idrossi-naftochinone; Wolley trovò attivo il 2,3-dicloro-1,4-naftochinone verso *Sacch. cerevisiae* ed *Endomyces vernalis;* Gonzales verso *Pen. notatum* trovò attivo il 2-metil-1,4-naftochinone, -idrochinone e -benzochinone; Colwell e McCall azione fungistatica e fungicida verso *Asp. niger* trovarono da parte del 2-metil-1,4-naftochinone e 2-metil-3metossi-1,4-naftochinone; Donatelli e Davoli, da noi, hanno riscontrato attivi vari derivati chinonici ed antrachinonici verso batteri patogeni.

Finalmente, pari azione inibente delle vitamine K è stata trovata da Oster e Golden e quindi da Arêa Leão e Da Rocha Fustado verso Dermatofiti, mentre Pratt e collaboratori hanno trovato microstatica, ancora verso Dermatofiti e alcuni lieviti, la vitamina K_5.

Il meccanismo di azione per mezzo del quale i corpi chinonici esplicano la ricordata azione fungistatica è certo complesso. Colwell e McCall pensano che « the mechanism of antibacterial and antifungal action of 2-methyl-1,4-napththoquinone is by blocking -SH enzymes or metabolites essential for growth. The inhibitory potency of methoxyquinone, however, even in the presence of sulphydryl compounds, and its failure to interfer with -SH tests indicate either, that the methoxyquinone, in spite of its structural similarity, functions by a different mechanism, or that the foregoing explanation for the activity of 2-metyl-1,4-naphtoquinone is incomplete ».

Non diversamente concludono Page e Waller.

Del resto altri pensano — e il fatto è verosimile — che i chinoni esercitino la loro azione antibiotica inibendo i processi respiratori.

Accertato il potere batterio- e micostatico di questi composti non era difficile pensare ad una qualche pratica utilizzazione di tali proprietà. Pratt e coll., infatti — e così altri prima — già hanno suggerito l'uso della K_5 contro le infezioni dermatofitiche e quale sostanza preservatrice dei composti di uso farmaceutico ed alimentare. Ciò può essere reso possibile anche per la veramente trascurabile tossicità di tale composto e quindi la buona tollerabilità da parte dell'organismo umano.

Peraltro non risulta che qualcuno abbia pensato ad un possibile impiego di tali sostanze in enologia, da usarsi in quei casi ove si richieda l'intervento di sostanze antifermentative. In particolare non risulta che

si sia pensato ai composti naftochinonici nel tentativo di sostituire, come oggi è reclamato, l'anidride solforosa.

È a questo scopo che sono state istituite le esperienze di cui qui si riferisce, esperienze condotte con il metil-naftochinone sodio bisolfito (commercialmente qualificato vitamina K_3) e con il 4-amino-2metil-1nafto-locloridrato (vitamina K_5).

Evidentemente, la prima esperienza da farsi era quella di saggiare il comportamento dei lieviti di fronte alla presenza di questi due composti. Nel desiderio di non limitare la ricerca ai lieviti di interesse enologico, la stessa ricerca si è portata anche su altre specie di lieviti.

All'uopo si è fatto uso del seguente mezzo alimentare:

destrosio anidro	gr.	30.—
asparagina	»	2.—
KH_2PO_4	»	1.5
$MgSO_4.7H_2O$	»	0.5
acqua dist.	cc.	1000

a 1.000 di tale mezzo alimentare è stato aggiunto cc. 0.1 di:

H_3BO_3	mg.	5.7
$CuSo_4.5H_2O$	»	18.6
$Fe(NH_4)_2.(SO_4)_2.6H_2O$	»	173.—
$MnSO_4.4H_2O$	»	8.1
$(NH_4)6MoO_{24}.4H_2O$	»	3.6
$ZnSO_4.7H_2O$	»	79.—
acqua dist.	cc.	100.—

quindi è stato ancora aggiunto, sempre per 1000:

biotina	μg.	10
tiamina	»	500
riboflavina	»	500
piridossina	»	500
niacina	»	500
calcio pantotenato	»	500
inositolo	»	10.000

Addizionato di vit. K_3 e K_5 nelle dosi di 0.5-0.1-0.05-0.01°/$_{oo}$, previa sterilizzazione, tale mezzo alimentare fu seminato con ugual numero di cellule di lievito e quindi incubato a 26°C.

Giova avvertire che, in parallelo, uguale esperienza fu allestita oltreché in mezzo liquido anche sullo stesso mezzo agarizzato.

Dopo un certo numero di giorni di coltura, nessuna fondamentale differenza registrandosi tra mezzo liquido e mezzo solido, si raccolsero i dati cui in Tab. 1.

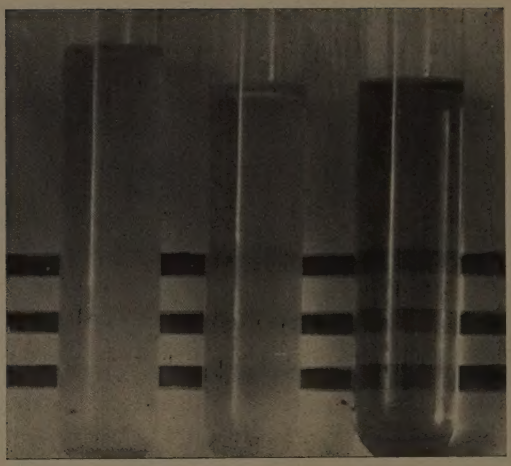


Fig. 1 - Sviluppo in mezzo sintetico di *Sacch. ellipsoideus*
a sinistra: controllo
in centro: presente K_5 0.05 °/oo
a destra: presente K_5 0.01 °/oo
(indice dell'intensità di sviluppo è la torbidità del liquido; a destra il liquido è rimasto sterile e, quindi, trasparente)

Fig. 2 - Sviluppo in mezzo sintetico di *Hansenula anomala*
a sinistra; controllo
in centro: presente K_5 0.01 °/oo
a destra: presente K_5 0.05 °/oo
(si noti, nel tubo di destra, la mancata formazione di vegetazione bianca in superficie al liquido)

TABELLA I

SVILUPPO DI VARI LIEVITI IN PRESENZA DI QUANTITÀ DIVERSE DI VITAMINA K_3 e K_5

SPECIE DI LIEVITO	Controllo	K_3 °/oo				K_5 °/oo			
		0.01	0.05	0.1	0.5	0.01	0.05	0.1	0.5
1. Sacch. ellipsoideus c. 101 . .	+	+	+	+ —	—	+	tr	—	—
2. » » c. Ott . .	+	+	+	+	—	+	—	—	—
3. » » c. Al. . .	+	+	+	+ —	—	+	—	—	—
4. » (Zygosacch.) Veronae .	+	+	+ —	—	—	+	—	—	—
5. » (Zigosacch.) gracilis . .	+	+	+ —	—	—	+ *	—	—	—
6. Torulaspora Rosei	+	+	+	+	—	+	—	—	—
7. Debaryomyces tyrocola . . .	+	+	+	+	—	+	—	—	—
8. Pichia membranaefaciens . .	+	+	+	+ —	—	+ —*	—	—	—
9. Saccharomycodes bisporus . .	+	+	+ —	—	—	tr	—	—	—
10. Hansenula anomala c. P . . .	+	+	+	+ —	—	+	+ —*	—	—
11. » » c. S . . .	+	+	+	+ —	—	+	—	—	—
12. Kloeckera apiculata c. 32 . .	+	+	+	—	—	+ —*	—	—	—
13. » » c. 43 . . .	+	+	+	+	—	+ —	—	—	—
14. Torulopsis utilis	+	+	+	+	—	+	—	—	—
15. Rhodotorula mucilaginosa . .	+	+	+ —	+ —	—	+	—	—	—
16. Candida pulcherrima	+	+	+	+ —	—	+	+ —	—	—
17. » albicans.	+	+	+	+	—	+	—	—	—
18. » tropicalis	+	+	+	+ —	—	+	+ —	—	—
19. Mycoderma sp.	+	+	+	+	—	+	+ —	—	—

* Sì nelle colture in agar; no o molto poco in mezzo liquido.

I dati riferiti indicano che l'azione della vitamina K_3 e della vitamina K_5 sono diverse e che l'azione antimicrobica della K_5 è notevolmente superiore a quella esercitata dalla K_3. Infatti, mentre l'azione antibiotica della K_3 si manifesta in pieno solo se presente nel mezzo in quantità non inferiori allo 0.5°/oo, l'azione della K_5 è già manifesta per concentrazioni dello 0.05°/oo.

Giova peraltro precisare che, con particolare riferimento ai mezzi liquidi, ciò verificasi nelle normali condizioni di semina. In altri termini ciò trovasi in rapporto alla massa di inoculo nel senso che un inoculo massivo può spostare ed abbassare i limiti di tossicità della vit. K_5.

Il fatto può essere illustrato dalla seguente esperienza complementare: tubi contenenti 10 cc. di mosto a buon titolo zuccherino non contenenti o contenenti nelle quantità dello 0.05°/oo e dello 0.1°/oo vit. K_5 sono stati inoculati con cc. 0.2-0.4-0.6-0.8 di una densa sospensione, in acqua, di lievito ellittico: quantità di semina, quindi, veramente notevoli. Ebbene, in tali casi, si è avuto sempre sviluppo del lievito e quindi fermentazione del liquido sebbene più o meno prontamente in rapporto alla concentrazione del prodotto e alla quantità di lievito inoculato.

TABELLA I *bis*

Dopo ore:	FERMENTAZIONE DEL MOSTO											
	in assenza di K_5				presente K_5 0.1 °/oo				0.05 °/oo			
	inoculo cc.				inoculo cc.				inoculo cc.			
	0.2	0.4	0.6	0.8	0.2	0.4	0.6	0.8	0.2	0.4	0.6	0.8
12	—	±	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
24	+	+			—	—	—	—	—	—	—	—
36					—	—	±	+	—	—	±	+
48					—	—	+		—	±	+	
60					—	±			—	+		
72					—	+			—			
84					—				±			

Per le specie di interesse enologico la ricerca doveva quindi estendersi a prove di fermentazione. All'uopo, mosto d'uva naturale, distribuito in matracci e sterilizzato fu addizionato o non di vit. K_3 o vit. K_5 e seminato in parte con un buon ceppo di lievito ellittico (*Sacch. ellipsoideus*) ed in parte con un lievito apiculato (*Kloeckera apiculata*). Avendo munito i matracci di valvola ad ac. solforico fu possibile seguire l'andamento del processo fermentativo registrandosi i dati che seguono:

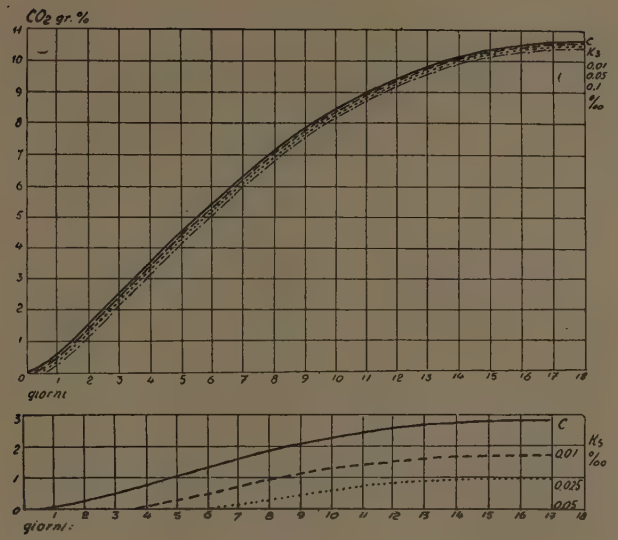


Fig. 3 - Curve di fermentazione di *Sacch. ellipsoideus* (in alto) e *Kl. apiculata* (in basso) in mosto non contenente o contenente vit. in quantità varie.

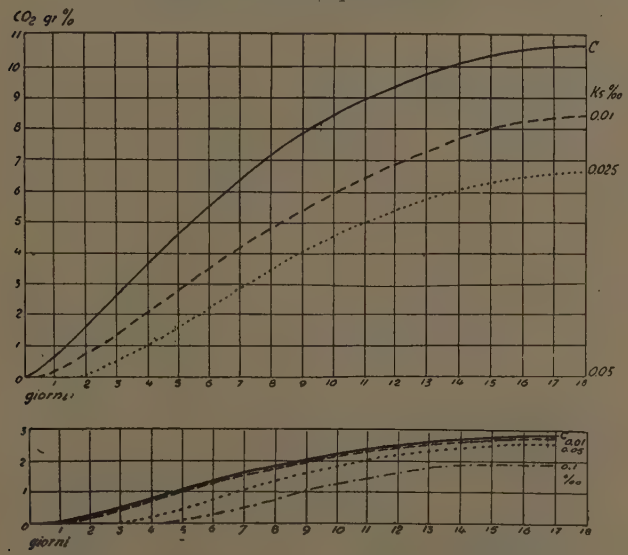


Fig. 4 - Curve di fermentazione di *Sacch. ellipsoideus* (in alto) e *Kl. apiculata* (in basso) in mosto non contenente o contenente vit. K_5 in quantità varie.

TABELLA II

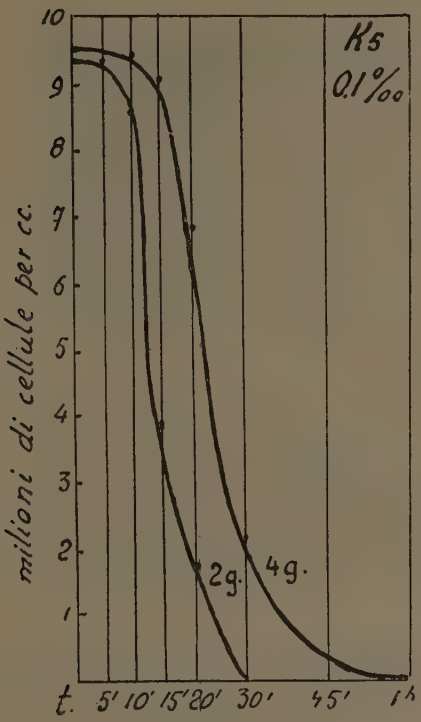
QUANTITÀ DI CO_2 IN GR. PER 100 cc. DI MOSTO ADDIZIONATO DI VIT. K_3 E VIT. K_5 E SEMINATO CON *SACCH. ELLIPSOIDEUS*

Dopo giorni	Controllo	Vit. K_3‰			Vit. K_5‰		
		0.01	0.05	0.1	0.01	0.025	0.05
1	0.620	0.614	0.622	0.610	0.248	0.000	nessuna fermentazione
2	1.625	1.625	1.630	1.621	0.750	0.085	
3	2.682	2.760	2.677	2.672	1.470	0.510	
4	3.705	3.693	3.710	3.690	2.105	1.004	
5	4.610	4.605	4.603	4.603	2.915	1.572	
6	5.540	5.542	5.536	5.530	3.582	2.220	
7	6.480	6.482	6.475	6.467	4.203	2.944	
8	7.265	7.260	7.258	7.250	4.905	3.460	
9	7.920	7.914	7.910	7.902	5.482	4.007	
10	8.450	8.445	8.442	8.440	6.004	4.560	
11	8.985	8.980	8.976	8.974	6.460	5.010	
12	9.405	9.408	8.410	8.402	6.922	5.367	
13	9.720	9.724	9.720	9.715	7.305	5.752	
14	10.085	10.082	10.080	10.061	7.720	6.004	
15	10.413	10.416	10.405	10.402	8.003	6.280	
16	10.520	10.522	10.518	10.512	8.305	6.483	
17	10.640	10.645	10.635	10.630	8.396	6.610	
18	10.685	10.676	10.672	10.665	8.402	6.653	

TABELLA III

QUANTITÀ DI CO_2 IN GR. PER 100 cc. DI MOSTO ADDIZIONATO DI VIT. K_3 E DI VIT. K_5 E SEMINATO CON *KLOECKERA APICULATA*

Dopo giorni	Controllo	Vit. K_3‰			Vit. K_5‰		
		0.01	0.05	0.1	0.01	0.025	0.05
1	0.038	0.027	—	—	—	—	nessuna fermentazione
2	0.193	0.178	—	—	—	—	
3	0.463	0.458	—	—	—	—	
4	0.872	0.865	0.165	—	0.090	—	
5	1.110	1.106	0.438	0.105	0.272	—	
6	1.403	1.398	0.802	0.270	0.525	0.014	
7	1.605	1.599	1.015	0.456	0.752	0.128	
8	1.851	1.845	1.403	0.755	1.003	0.265	
9	2.012	2.004	1.610	0.990	1.132	0.472	
10	2.220	2.216	1.817	1.233	1.250	0.630	
11	2.412	2.405	2.002	1.450	1.438	0.750	
12	2.605	2.601	2.140	1.603	1.600	0.842	
13	2.700	2.701	2.315	1.764	1.675	0.905	
14	2.782	2.775	2.402	1.860	1.724	0.934	
15	2.845	2.837	2.520	1.885	1.748	0.951	
16	2.880	2.870	2.601	1.892	1.757	0.960	
17	2.912	2.901	2.650	1.898	1.763	0.965	
18	2.916	2.912	2.698	1.904	1.772	0.967	



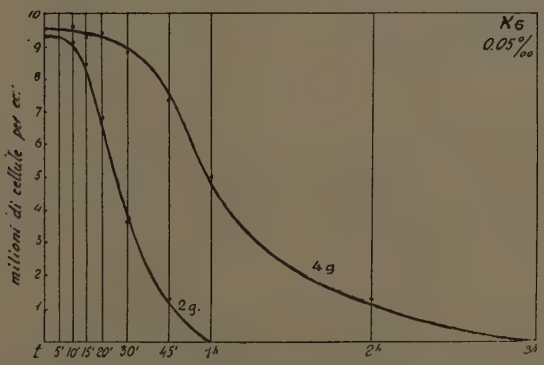


Fig. 5 - Curve di sopravivenza di *Sacch. ellipsoideus* previo contatto per tempi diversi con vit. K_5 allo 0.1 °/oo e allo 0.05 °/oo

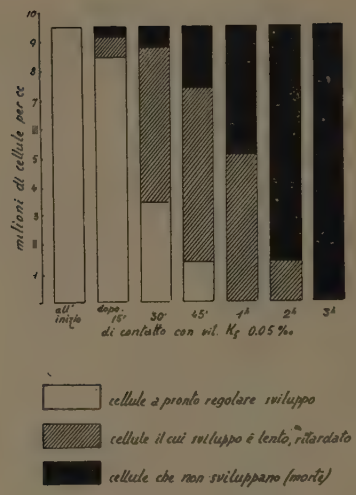


Fig. 6 - Numero di cellule di *Sacch. ellipsoideus* che sviluppano tardivamente o non sviluppano dopo essere state in contatto per tempi diversi con vit. K_5 allo 0.05 $^0/_{00}$

I dati raccolti indicano:

1° - Lavitamina K_3, nella massima dose aggiunta dello 0,1$^0/_{00}$, nessuna influenza esercita sull'attività fermentativa di *Sacch. ellipsoideus*. Peraltro una qualche influenza è esercitata, a tale dose, sul lievito apiculato.

2° - La vitamina K_5 nella dose dello 0.05$^0/_{00}$ blocca completamente in normali condizioni di semina il processo fermentativo e quindi l'attività sia del lievito ellittico che del lievito apiculato. Concentrazioni minori allo 0.05$^0/_{00}$ non sopprimono l'attività fermentativa; la fermentazione però inizia più tardi e si svolge più lentamente.

La presenza nel mezzo della vitamina K_5 già nella dose dello 0.05$^0/_{00}$ arresta dunque ogni attività da parte dei lieviti.

Tale fatto, giova ripeterlo, deve comunque intendersi relativo alle normali condizioni di esperienza o, meglio, di semina. Qualora, infatti, il mosto reso muto per presenza di vit. K_5 *venga di nuovo inoculato e ino-*

culato massivamente, la fermentazione riprende, sia pure più o meno lentamente, tendendo a seguire il suo svolgimento normale.

Con tutto ciò, ci siamo chiesti se, il ricordato arresto, era semplicemente dovuto ad una insorta inattività della cellula o non piuttosto alla sua morte.

Per questo abbiamo preparato una sospensione di cellule di lievito ellittico, numericamente controllata, in acqua distillata e in una soluzione in acqua distillata di vit. K_5 nelle proporzioni dello 0.1°/₀₀ e 0.005°/₀₀. Di tempo in tempo, cioè dopo 5'-10'-15'-20'-30'-45' e 1-2-3 ore, si è proceduto alla conta delle cellule rimaste vive nelle tre diverse sospensioni [1].

Si è ottenuto:

TABELLA IV

SOPRAVVIVENZA DI CELLULE DI *SACCH. ELLIPSOIDEUS* IN ACQUA CONTENENTE VIT. K_5 IN FUNZIONE DEL TEMPO

Tempo di azione	NUMERO DI CELLULE VIVE (CAPACI DI SVILUPPARSI) IN 1 CC. DI					
	acqua d. (controllo) dopo un'incubazione		sol. K_5 0.1 ‰ dopo un'incubazione		sol. K_5 0.05 ‰ dopo un'incubazione	
	di 2 g.	di 4 g.	di 2 g.	di 4 g.	di 2 g.	di 4 g.
inizio . .	9.370000	9.525000	9.280000	9.530000	9.275000	9.640000
dopo 5' .	9.284000	9.395000	9.260000	9.600000	9.310000	9.550000
» 10' .	9.465000	9.730000	8.300000	9.410000	9.160000	9.725000
» 15' .	9.135000	9.470000	3.750000	9.100000	8.400000	9.310000
» 20' .	9.325000	9.620000	1.940000	7.050000	7.010000	9.500000
» 30' .	9.120000	9.330000	—	2.100000	3.690000	5.725000
» 45' .	9.510000	9.450000	—	150000	1.330000	7.500000
» 1h. .	9.430000	9.560000	—	—	—	5.080000
» 2h. .	9.060000	9.230000	—	—	—	1.280000
» 3h. .	8.760000	9.010000	—	—	—	—

[1] Non è il caso di intrattenersi sul metodo seguito per questa ricerca. Diremo tuttavia che molti eseguiscono la conta diretta, in vetrino contacellule, dopo avere trattato il preparato con una soluzione colorante utilizzando il principio che le cellule morte prendono immediatamente il colore e quindi si colorano intensamente e uniformemente, mentre le cellule vive si colorano meno o meno uniformemente. Ancorché sufficientemente orientativo noi non abbiamo seguito tale metodo perché è spesso causa di qualche errore, e seguito invece il metodo colturale. Ai tempi stabiliti abbiamo preso, cioé, una aliquota della sospensione cellulare e, diluita in un volume noto di acqua sterile, con volumi noti si sono inficiate piastre allestite con agar-fagiuoli e agar-malto. Si procedeva quindi alla conta delle colonie sviluppatesi dopo 2 e dopo 4 giorni di incubazione in termostato.

Questi risultati provano che la sterilità del mezzo quando non si tratti di inoculo massivo si raggiunge in un tempo più o meno breve in rapporto alla quantità di composto presente. Ma gli stessi risultati indicano che allorquando il contatto con la sostanza sia tale da non provocare la morte di tutte le cellule, quelle sopravissute sviluppano in gran parte tardivamente, lentamente. Prolungandosi poi l'azione del composto non si hanno che cellule a lento e tardivo sviluppo fino a che anche queste soccombono e più nessuna cellula risulta capace di svilupparsi.

Concludendo rimane dunque provato che la vitamina K_5 manifesta azione sterilizzante notevole anche nei riguardi dei lieviti di interesse enologico. La quantità dello 0.005% impedisce infatti in un mezzo fermentescibile lo sviluppo di ogni specie di lievito, in quanto, bene inteso, esso sia presente in quantità non eccessivamente abbondanti. I limiti di azione del composto sono, infatti, funzione della sua concentrazione e del numero di cellule presenti nel mezzo.

Trattandosi di un composto non tossico, ma anzi ad azione fisiologica, il suo uso in enologia si prevede comunque tecnicamente possibile.

Dall'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università di Pisa.

BIBLIOGRAFIA

1 - Area Leao A. E. e Da Rocha Furtado A. - *The fungistatic activities of vitamin K on dermatophytes.* Mycopathologia, 5, *121*, 1950.

2 - Ball E. G., Anfinsen C. B. e Cooper O. - *The inibitory action of naphthoquinones on respiratory processes.* J. Biol. Chem. 168, *257*, 1947.

3 - Collins J. G., Mc Gavack T. H. e Boyd L. J. - *The effect of tetrachloroparabenzoquinone upon human fungus infections.* Urol. Cut. Rev., 50 *276*, 1946.

4 - Colwell C. A. e Mc Call M. - *Studies on the mechanism of antibacterial action of 2-methyl-1,4-naphthoquinone.* J. Bact., 51, *659*, 1946.

6 - Davoli R. e Donatelli L. - *Ulteriori osservazioni sull'attività antibatterica dei naftochinoni.* Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 22, 1946.

7 - Donatelli L. e Davoli R. - *Attività antibatterica della vitamina K sintetica e di altri corpi chinonici e antrachinonici.* Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 22, 1946.

8 - Gonzales F. - *The inhibiting effect of quinones on the growth of Penicillium notatum.* Scienze, 101, *494*, 1945.

9 - Mc Gavack T. H., Weiner D., e altri. - *Influence of tetrachloro-parabenzoquinone on human fungous infections.* Arch. Dermatol. Syphilol., 59, *94*, 1949.

10 - Page J. E. e Waller J. G. - *Inactivation of antibacterial substances with cysteina.* Nature, 157, *838*, 1946.

11 - Pratt R., Dufrenoy J., Sah P., Oneto J., Brodie D., Riegleman S. e Pickering V. - *Vitamin K as an Antimicrobial Medicament and Preservative.* Journ. Am. Pharm. Ass., 39, *127*, 1950.

12 - Ter Horst W. P. e Felix E. L. - *2-3-dichloro-1,4-naphthoquinone. A potent organic fungicide.* Ind. Eng. Chem., 35, *1255*, 1943.

13 - Vinet A. - *Activité bactériostatique dans la série de la méthyl-naphthoquinone. Son rapport éventuel avec l'isomorphisme.* C. R. Soc. Biol., 139, *155*, 1945.

14 - Woolley D. W. - *Observations on antimicrobial action of 2-3-dichloro-1,4-naphthoquinone, and its reversal by vitamins K.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 60, *225*, 1945.